蔗糖对发根农杆菌 C58C1 诱导烟草毛状根生长的影响

向 润[1]，江 龙[1*]

（贵州大学 生命科学学院/农业生物工程研究院，山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室，山地生态与农业生物工程协同创新中心，贵阳 550025）

摘要：毛状根良好的生长状况是建立毛状根-AM 真菌双重培养体系的关键，为优化毛状根培养基成分，确定适宜毛状根生长的蔗糖浓度，改善烟草毛状根的生长状况，该研究以发根农杆菌菌株 C58C1 诱导 2 个烟草品种 NC82 和 Va116 叶片产生毛状根，经 PCR 检测证实后，用含有不同蔗糖浓度的 1/2MS 培养基分别进行固体和液体优化培养，通过测定毛状根的分枝数、鲜重（FW）与干重（DW），研究蔗糖对 2 个品种烟草毛状根生长的影响。研究结果表明，C58C1 均能诱导两种烟草叶片产生毛状根，但诱导率不同，NC82（87.3%）的诱导率更高，是 Va116（38.6%）的 2.26 倍。培养基蔗糖浓度显著影响毛状根生长，因烟草品种和起始分枝数而异。固体培养基优化培养 NC82 和 Va116 诱导的毛状根，分枝数增长的抑制蔗糖浓度分别为 25 g·L^{-1} 和 15 g·L^{-1}；液体培养基优化培养分别在 25 g·L^{-1} 和 15 g·L^{-1} 时 F（D）W 达到最大，分别为 0.541 g（0.055 g）、0.474 g（0.050 g）。综合分枝数、F（D）W、毛状根生长势的考虑，C58C1 诱导 NC82 毛状根最适培养基蔗糖浓度为 25 g·L^{-1}，Va116 毛状根为 15 g·L^{-1}。该文优化了烟草毛状根培养基组成的适宜蔗糖浓度及培养方法，为后续毛状根大量扩繁奠定基础，也为建立毛状根-AM 真菌双重培养体系解决了关键的寄主生长不良的问题。

关键词：毛状根，蔗糖，培养基优化，分枝数，鲜重，干重

Effects of sucrose on growth of tobacco hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* C58C1

XIANG Run[1], JIANG Long[1]*

(*Key laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology & Agro-Bioengineering(CICMEAB), College of Life Sciences/Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University*, Guiyang 550025, China)

Abstract: As the host, the hairy roots have good growth conditions, which is the key to establish the hairy root-AM fungus dual culture system. This study reported that the two types of tobacco hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* C58C1 were optimized for solid and liquid culture on 1/2MS medium with different sucrose concentrations and confirmed by PCR. By measuring the number of branches, fresh weight (FW) and dry weight (DW) of hairy roots, the effect of sucrose on the growth of two tobacco hairy roots was studied. Screen the sucrose concentration suitable for the growth of tobacco hairy roots to optimize the medium composition

---

收稿日期：2021-01-09

基金项目：国家科技支撑项目（2015BAD04B0204）[Supported by the National Key Technology Research and Development Program of China（2015BAD04B0204）]。

作者简介：向润（1996-），硕士研究生，研究方向为菌根生物学，(E-mail) 2141700255@qq.com。

*通信作者：江龙（1970-），博士，教授，研究方向为植物生理学、菌根生物学，(E-mail) ljiang@gzu.edu.cn。

and improve the growth of hairy roots. The results were as follows: C58C1 could induce hairy roots in both tobacco leaves, but the induction rate was different. The induction rate of NC82 (87.3%) was higher, which was 2.26 times that of Va116 (38.6%). The number of hairy root branches induced by NC82 and Va116 increased with the incubation time, and the increased amount varied with the concentration of sucrose. Sucrose has a significant effect on the growth of hairy roots, depending on the tobacco variety and the number of initial branches. The solid medium was optimized to cultivate hairy roots induced by NC82 and Va116, and the inhibitory sucrose concentrations for branch number growth were 25 g·L^{-1} and 15 g·L^{-1}, respectively. In addition, the results of liquid optimized culture showed that the hairy roots induced by NC82 and Va116 reached the maximum F(D)W at 25 g·L^{-1} and 15 g·L^{-1}, respectively, which were 0.541 g (0.055 g) and 0.474 g(0.050 g) respectively, which was mutually corroborated with solid optimized culture. The present data suggest that the concentration of sucrose in the medium significantly affects the growth of hairy roots. Considering the number of branches, F(D)W, and hairy root growth vigor, C58C1 induces NC82 hairy roots with optimal sucrose The concentration is 25 g·L^{-1}, and the hairy root of Va116 is 15 g·L^{-1}. The study of tobacco hairy roots optimized the suitable sucrose concentration in the medium, laying a foundation for subsequent large-scale propagation of hairy roots; at the same time, the problem of poor growth of hairy roots as a host was solved.

Key words: hairy root, sucrose, optimization of medium, branch number, fresh weight, dry weight

从枝菌根（arbuscular mycorrhizal，AM）真菌能与地球上 80%以上的陆生维管植物形成互惠共生体（刘润进和陈应龙，2007；夏庭君等，2018），可促进植物吸收土壤矿质营养（Hodge et al.，2001；江龙等，2010），提高植物抗逆性、抗病性（María & Concepción，2007；Porcel et al.，2012；Augéet al.，2015；王丹丹等，2019），改善土壤结构（Rillig & Mummey，2010；Leifheit et al.，2014；），修复土壤重金属污染等（Ghre & Paszkowski，2006；Meier et al.，2015），既可作天然菌肥，又可作生防制剂，在农（林）业生产中，有着巨大的应用前景。但 AM 真菌是专性共生体，需与寄主植物共生，才能生长和完成生活史，所以 AM 真菌目前还不能纯培养，这使得 AM 真菌菌剂规模化生产受到极大限制（Berruti et al.，2016）。以 Ri T-DNA 转型根（以下简称毛状根）为寄主，接种 AM 真菌孢子，建立毛状根-AM 真菌双重培养体系，是解决 AM 真菌纯培养和菌剂规模化生产的有效途径（Jolicoeur et al.，1999）。研究表明，毛状根的生长状况对 AM 真菌的侵染、生长发育和产孢均有显著影响，是建立毛状根-AM 真菌双重培养体系的关键条件（冉海燕，2016）。

利用发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）侵染植物叶片等外植体，其自身携带的 Ri 质粒上的 T-DNA 片段在进入植物细胞后随机整合，利用植物体内的酶系统进行转录和表达，可产生大量毛状根（Kregtenmv et al.，2016）。毛状根是利用转基因技术实现的，经遗传转化筛选得到的单克隆体，具有很强的稳定性。本项目前期研究表明，发根农杆菌菌株 C58C1 可诱导烟草叶片产生毛状根，但毛状根的生长状况受到培养基组成、植物生长物质、培养条件的影响（黄丽萍等，2012；卢锡锋，2020）。毛状根培养中，培养基常用的碳源有蔗糖、果糖和葡萄糖，毛状根快速生长需要较多的碳原子数和较高的能量（李凤华等，2004），葡萄糖和果糖的碳原子数和能量都不如蔗糖，蔗糖更易于被植物细胞感知，分解转化获得较高能量，有利于毛状根生长（Gibson，2005）。要建立烟草毛状根-AM 真菌双重培养体系，首先要求良好的毛状根培养体系，培养基中蔗糖浓度直接影响烟草毛状根生长，值得深入研究。

本试验以发根农杆菌菌株 C58C1 诱导 2 个烟草品种 NC82 和 Va116 叶片产生毛状根，经 PCR 检测证实后，将毛状根置于含有不同蔗糖浓度的 1/2MS 培养基中进行优化培养，通过测定毛状根的分枝数、鲜重和干重，研究蔗糖浓度对 2 个品种烟草毛状根生长的影响，从

而确定烟草毛状根优化培养基组成的适宜蔗糖浓度及培养方法。研究结果将为建立烟草毛状根-AM 真菌双重培养体系提供基础条件，也为其他植物材料诱导毛状根提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

发根农杆菌菌株：C58C1，贵州大学生命科学学院生物化学实验室提供。

烟草品种：NC82、Va116，贵州大学生命科学学院植物生理实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 毛状根诱导

烟草无菌苗的获得：参见卢锡锋（2020）的方法，用 75%酒精和 10%次氯酸钠消毒获得烟草无菌苗。

发根农杆菌 C58C1 菌种侵染液制备：参见卢锡锋（2020）方法进行菌液活化，用 MS 液体培养基（含 100 umol·L^{-1} 乙酰丁香酮）悬浮，即侵染菌液。

诱导毛状根：参见卢锡锋（2020）的方法，将经预培养 2~3 d 的烟草叶片（2 cm × 2 cm）放入悬浮菌液，侵染约 8~10 min，置于 MS 培养基上（培养基中蔗糖浓度为 30 g·L^{-1}），黑暗条件下共培养 2~3 d 后，转入抑菌培养基（含 500 mg·L^{-1} 头孢霉素、100 mg·L^{-1} 特美汀），诱导出毛状根。挑选生长快、长势旺盛且分枝多的毛状根，用 1/2MS 培养基进行扩繁，25 ℃暗培养，供毛状根优化培养阶段选用。

1.2.2 毛状根的优化培养及生长测定

PCR检测：参见胡霄等（2015）的方法，使用PCR对NC82和Va116两种烟草叶片诱导产生的根进行检测。

固体优化培养：用 1/2MS 固体培养基培养诱导得到的毛状根，其中设置不同烟草品种（NC82 和 Va116）、起始分枝数（起始 0 分枝和 1~2 分枝）、蔗糖浓度（0、5、10、15、20、25、30、35、40 g·L^{-1}）3 个因素，共 36 个处理，每个处理 3 组，每组 3 皿（培养皿直径 90 mm）。调节培养基 pH 至 5.8~6.0，培养时毛状根于 25 ℃暗培养，每 2 d 统计不同起始分枝量毛状根在不同处理的分枝数，累计 20 d。

液体优化培养：在固体优化培养的基础上，配制 1/2MS 液体培养基，其中蔗糖浓度分别为 15、20、25、30 g·L^{-1}，4 个处理，每个处理 3 个重复，调节 pH 至 5.8~6.0，每 150 mL 锥形瓶装入 80 mL 培养基，灭菌冷却备用。在超净台中取活力较好的毛状根置于含有不同蔗糖浓度的培养基中，25 ℃避光悬浮培养，转速为 110 r·min^{-1}。悬浮培养 30 d 后，迅速用滤纸擦干，测得鲜重（FW），然后在 102~105 ℃烘箱中杀青 10 min，把烘箱温度降低至 70~80 ℃烘至恒重，冷却至室温测其质量为干重（DW）。

毛状根诱导率（%）=（产生毛状根的外植体数量/外植体总数量）×100。

试验数据采用Microsoft Excel 2010 和SPSS 22.0进行分析。

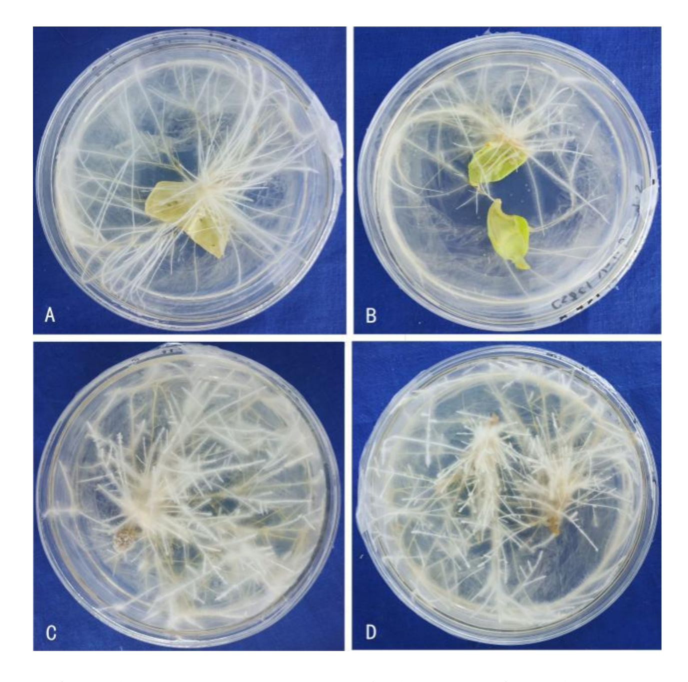
2 结果与分析

2.1 毛状根诱导状况及 PCR 鉴定结果

发根农杆菌 C58C1 可诱导 NC82 和 Va116 两种烟草叶片产生毛状根。用菌液将 NC82 和 Va116 两种烟草叶片进行侵染，一周左右叶片伤口处出现毛状根，12 d 后 C58C1 对 NC82、Va116 的毛状根诱导率分别为 54.4%、20.5%，一周后（19 d）增加到 87.3%、38.6%。诱导出的毛状根分枝多，生长速度快，可在无激素培养基上正常生长（图 1）。

经 PCR 检测，NC82 和 Va116 两种烟草叶片诱导产生的根均为毛状根。两种烟草毛状根的 DNA 经 PCR 扩增后，均检测出特异性扩增产物，通过与发根农杆菌 C58C1 阳性对照和 DNA 分子量标记（M）比较，可确定待测毛状根中均含有 *rolB* 基因的片段（约 741 bp）（图 2），结果表明发根农杆菌中 Ri 质粒的 *rolB* 基因已整合入 NC82 与 Va116 细胞基因组中，*rolB*

基因表达使两种烟草叶片长出毛状根。

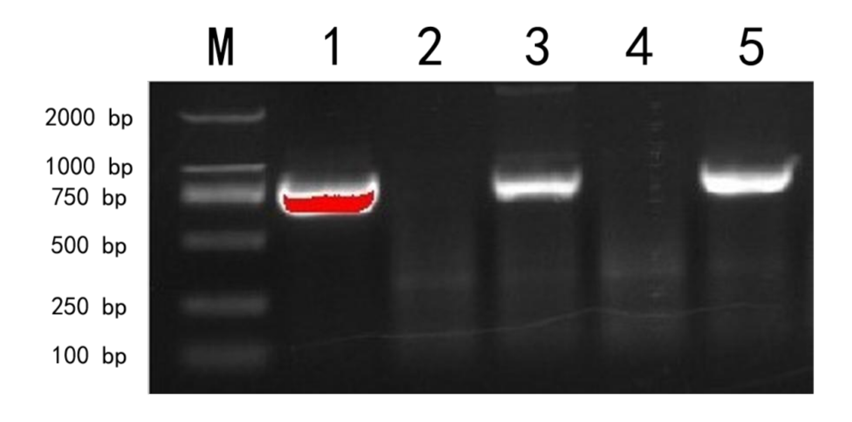


A, C. C58C1 侵染 NC82 诱导出的毛状根；**B, D**. C58C1 侵染 Va116 诱导出的毛状根。

A, C. Hairy roots induced by C58C1 infecting NC82; **B, D**. Hairy roots induced by C58C1 infecting Va116.

图 1 毛状根诱导情况

Fig.1 Hairy root induction



M. 核酸相对分子质量标准 DL2000 bp；**1** 为发根农杆菌 C58C1，作为阳性对照；**2**、**4** 分别为 NC82、Va116 未转化根，作为阴性对照；**3**、**5** 分别为 C58C1 侵染 NC82、Va116 诱导出的毛状根。

M. Nucleic acid relative molecular weight standard DL2000 bp; **1** is Agrobacterium rhizogenes C58C1, as a positive control; **2,4** are NC82, Va116 untransformed roots, respectively, as a negative control; **3, 5** are C58C1 infection of NC82, Va116 induced hairy roots, respectively.

图 2 毛状根 *rolB* 基因 PCR 检测

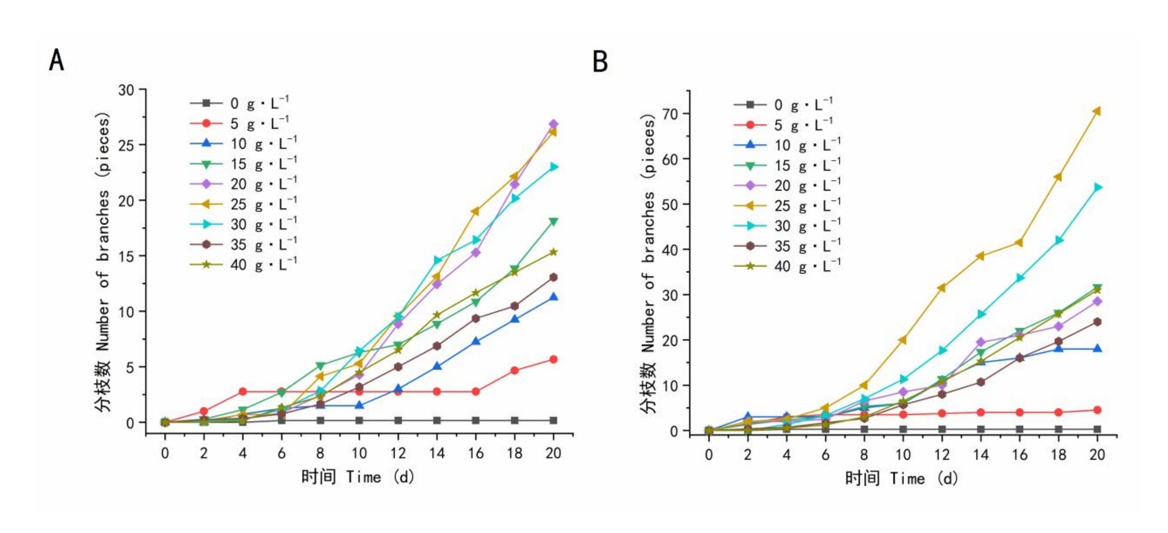
Fig. 2 Hairy root *rolB* gene PCR detection

2.2 蔗糖浓度对毛状根生长的影响

2.2.1 固体培养基不同蔗糖浓度对毛状根分枝增长的影响

结果表明，NC82 和 Va116 诱导的毛状根分枝数量随培养时间而增加，增加量因蔗糖浓度而异（图 3，图 4）。蔗糖浓度为 0 和 5 g·L^{-1}时，NC82 和 Va116 起始 0 分枝和 1~2 分枝的毛状根分枝增加量均为最低，在培养 4 天后，分枝数增加到 8 条趋于停止；蔗糖浓度为 10 g·L^{-1}时，除 NC82 起始 1~2 分枝的毛状根在培养 14 d 后，分枝数增加到 18 条趋于停止，其余处

理随培养时间而增加。蔗糖浓度为 15、20、25、30、35、40 g·L-1 时，各处理的毛状根分枝数均随培养时间而增加，培养 20 d 时，毛状根分枝数均为最大，其中 NC82 起始 0 分枝，毛状根分枝数分别达到 18、27、26、23、13、15；起始 1~2 分枝，达到 32、29、71、54、24、31。Va116 起始 0 分枝，毛状根分枝数达到 29、12、25、8、8、16；起始 1~2 分枝，达到 75、30、40、25、24、25。



A. 起始 0 分枝；**B**. 起始 1~2 分枝。下同。

A. Start with 0 branches; **B**. Start with 1-2 branches. The same below.

图 3 C58C1-NC82 毛状根分枝增加趋势

Fig.3 C58C1-NC82 hairy root branch increasing trend

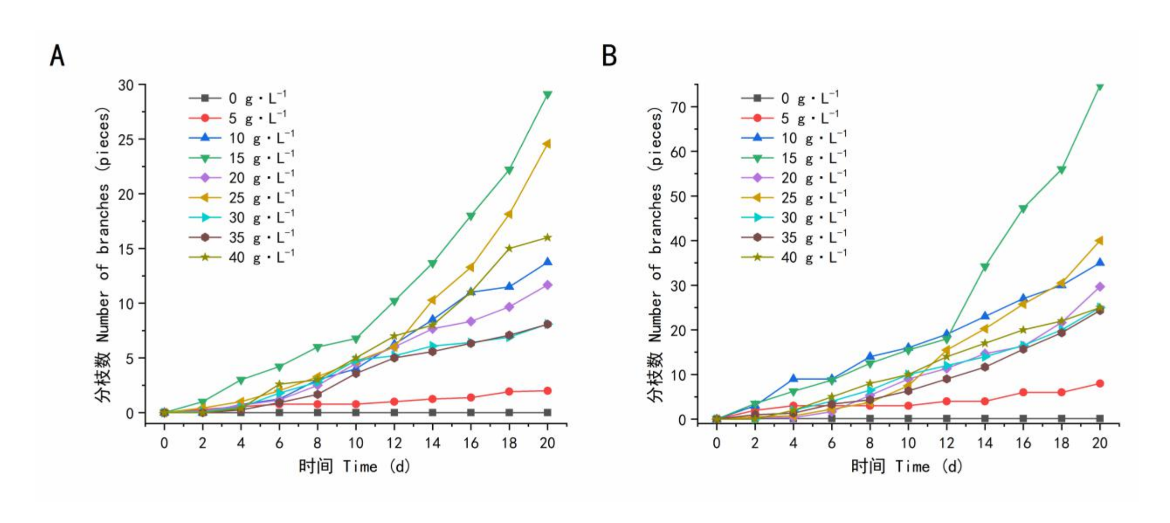


图 4 C58C1-Va116 毛状根分枝增加趋势

Fig.4 C58C1- Va116 hairy root branch increasing trend

蔗糖浓度显著影响 NC82 和 Va116 诱导的毛状根分枝数量，因烟草品种和起始分枝数而异（图 5，图 6）。在蔗糖浓度为 0~40 g·L-1 范围内，各处理毛状根分枝数量均呈现随蔗糖浓度先增加后减少的变化规律，不同蔗糖处理存在其特有抑制浓度。NC82 起始 0 分枝的毛状根分枝数量在蔗糖浓度为 0~20 g·L-1 时，随浓度增加，毛状根分枝数量增加，培养 20 天时，达到 27 条分枝，20 g·L-1 为其抑制浓度，超过后，随浓度增加毛状根分枝数量减少；NC82 起始 1~2 分枝的抑制浓度为 25 g·L-1。Va116 起始 0 分枝的抑制浓度为 15 g·L-1，1~2 分枝为 15 g·L-1。

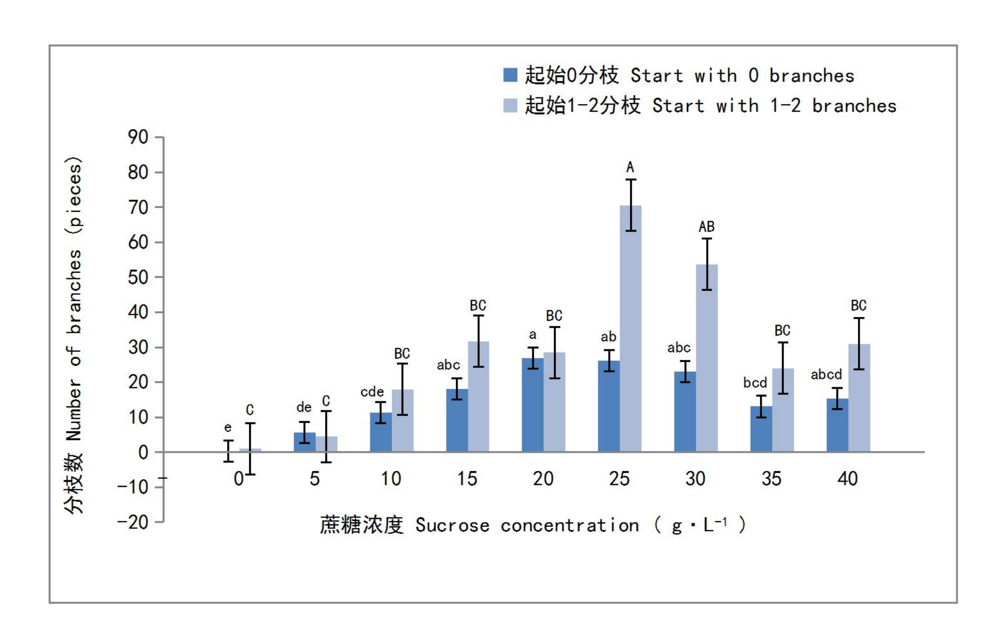


图 5 不同蔗糖浓度之间 C58C1-NC82 毛状根分枝数（第 20 天）

Fig.5 Number of branches of C58C1- NC82 hairy roots between different sucrose concentrations (on the 20th d)

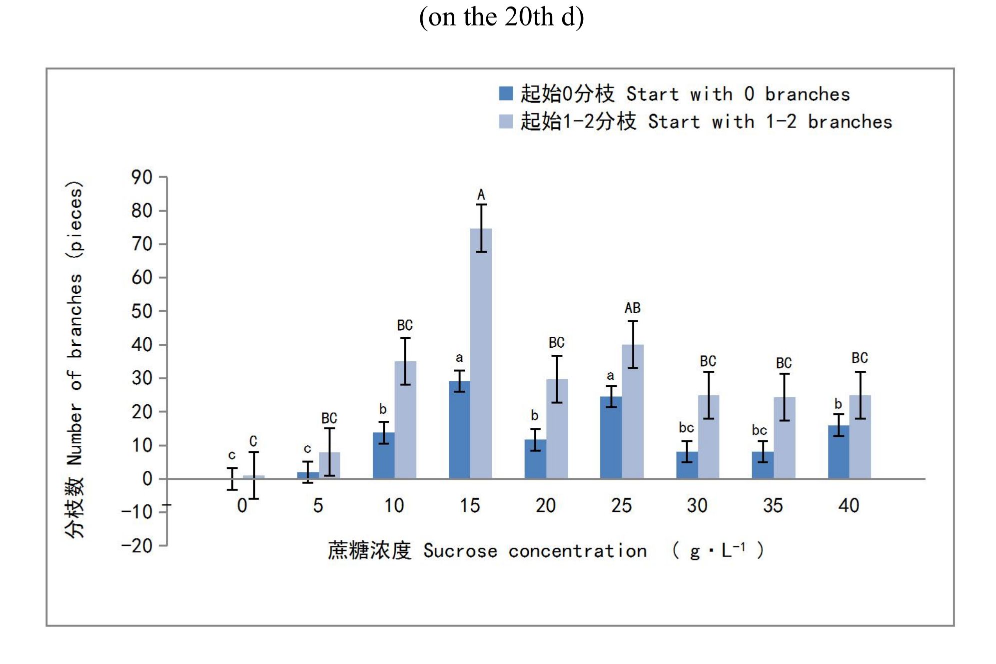


图 6 不同蔗糖浓度之间 C58C1-Va116 毛状根分枝数（第 20 天）

Fig.6 Number of branches of C58C1-Va116 hairy roots between different sucrose concentrations (on the 20th d)

所以，固体培养基优化培养中，NC82 诱导的毛状根适宜的蔗糖浓度为 20~30 g·L^{-1}；Va116 诱导的毛状根为 15~25 g·L^{-1}。

2.2.2 液体培养基中不同蔗糖浓度对毛状根重量的影响

蔗糖浓度显著影响 NC82 和 Va116 诱导的毛状根生长量的积累和生长状况，因烟草品种而异（表 1，图 7）。在蔗糖浓度 15~30 g·L^{-1} 范围内，NC82 诱导的毛状根 FW、DW 呈现先增加后减少的规律，在蔗糖浓度为 25 g·L^{-1} 时 FW、DW 最高，分别为 0.541 g、0.055 g。Va116 诱导的毛状根不同，在 15 g·L^{-1} 时 FW、DW 最高，分别为 0.474 g、0.050 g，之后随蔗糖浓度增加逐渐减少。培养 30 天后，15 g·L^{-1} 处理 NC82 和 Va116 诱导的毛状根分枝较多，根体较细且褐化少；30 g·L^{-1} 处理毛状根分枝变少，且褐化明显，褐化的毛状根变粗、变硬，脆

而易断（图 7）。

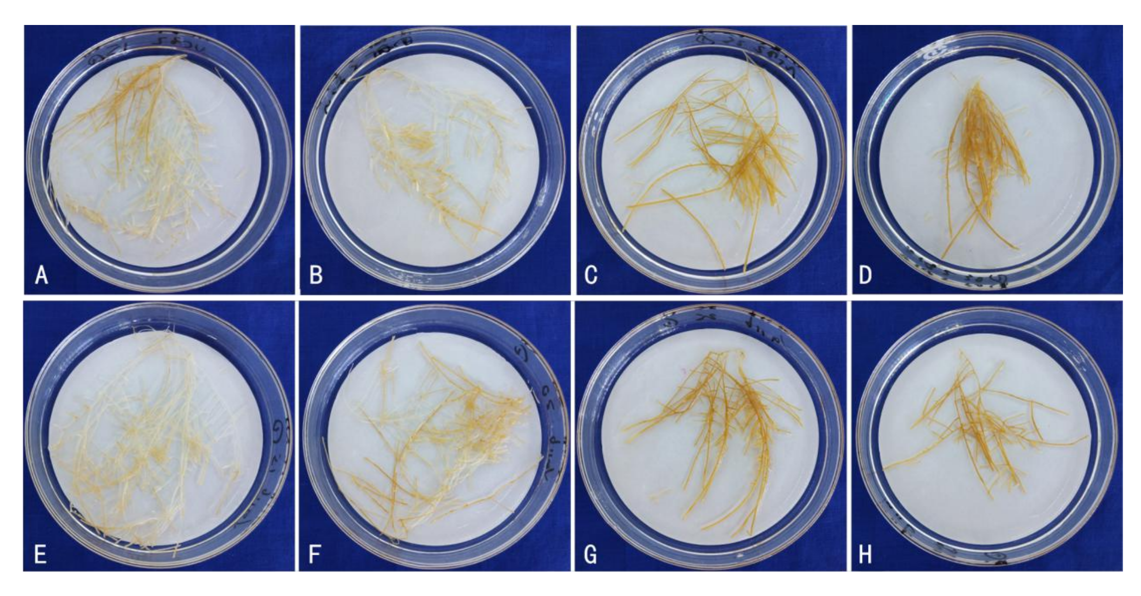
表 1 不同蔗糖浓度下两种毛状根 FW 与 DW（ $\bar{x} \pm s$，n=3）

Table 1 Two hairy roots FW and DW under different sucrose concentrations ($\bar{x} \pm s$, n=3)

蔗糖浓度 Sucrose concentration (g·L^{-1})	NC82		Va116	
	FW (g)	DW (g)	FW (g)	DW (g)
15	0.371±0.020 b	0.038±0.005 AB	0.474±0.026 a	0.050±0.004 A
20	0.317±0.059 bc	0.034±0.006 B	0.357±0.046 b	0.037±0.001 B
25	0.541±0.118 a	0.055±0.011 A	0.208±0.047 c	0.025±0.007 BC
30	0.172±0.030 c	0.024±0.006 B	0.139±0.038 c	0.016±0.005 C

字母表示不同处理间的差异（P<0.05）。（图 6、表 1 同）。

Letters indicate the difference between different treatments (P <0.05). (The same as in Fig.6 and Table 1).



A. NC82-15 g·L^{-1}; **B**. NC82-20 g·L^{-1}; **C**. NC82-25 g·L^{-1}; **D**. NC82-30 g·L^{-1};
E. Va116-15 g·L^{-1}; **F**. Va116-20 g·L^{-1}; **E**. Va116-25 g·L^{-1}; **H**. Va116-30 g·L^{-1}.

图 7 四种蔗糖浓度处理毛状根悬浮培养生长情况（第 30 天）

Fig.7 Growth of hairy roots in suspension culture treated with four sucrose concentrations (on the 30th d)

综合固体优化培养毛状根分枝数的增加和液体优化培养毛状根的 F（W），可得出结论：发根农杆菌 C58C1 诱导烟草 NC82 和 Va116 毛状根最适宜的培养基蔗糖浓度分别为 25 g·L^{-1} 和 15 g·L^{-1}。

3 讨论与结论

AM 真菌专性共生的特性限制了其在农（林）业生产中的应用，以毛状根为寄主，接种 AM 真菌孢子，建立毛状根-AM 真菌双重培养体系，是解决 AM 真菌纯培养和菌剂规模化生产的有效途径。我们前期研究表明，盾巨孢囊霉属（*Scutellospora*）可与发根农杆菌 A4 诱导的烟草毛状根建立了共生体系，并产生新孢子（冉海燕，2016）；幼套近明球囊霉 (*Claroideoglomus etunicatum*) 可与发根农杆菌 C58C1 和 A4 诱导的烟草毛状根建立共生体

系（卢锡锋，2020），实现了毛状根-AM 真菌双重培养。同时，我们发现，毛状根生长状况、培养基成分、外源物质、pH、温度等都会影响双重培养体系中 AM 真菌孢子的生长（曹玲，2009；冉海燕，2016；卢锡锋，2020）。

作为寄主的毛状根的生长状况，对 AM 真菌的连续大规模生产具有重要意义，毛状根生长不良会限制 AM 真菌生长发育。影响毛状根生长的因素（培养基、pH、光照、温度等）中，培养基中的蔗糖为毛状根的生长提供适宜的能量和能源，是影响毛状根生长的决定性因素（刘高等，2007），是双重培养体系中培养基的关键组分（Bécard & Fortin，1988），蔗糖浓度对毛状根的生长和孢子的发育均有显著影响（Mohan et al.，2017）。

在离体组织培养过程中，碳源可作为底物为植物生长提供能量（Staikidou et al.，2005），并调节培养基溶液渗透压（Neto & Otoni，2003）。蔗糖是最常用的碳源，是培养基组成成分中的关键因子（田翠婷等，2007），在植物体细胞组织培养中，蔗糖一直作为标准碳源（丁世萍等，1998），大多数合成培养基均以蔗糖作为唯一的碳源（刘冬云等，2005），但要注意使用浓度。吕芝香（1981）的观点是，在植物组织培养中最适宜的蔗糖浓度为 20~40 g·L^{-1}。也有研究证明，培养基中蔗糖为 30 g·L^{-1} 时石斛毛状根（李凤华等，2004）、三裂叶野葛毛状根（何含杰等，2005）和金铁锁毛状根（刘兴斌等，2018）生长最快；使用组合碳源（20 g·L^{-1} 蔗糖和 30 g·L^{-1} 葡萄糖）最有利于水母雪莲毛状根生长（杨睿等，2005）。在毕银丽等（1999；2000）的研究中，用发根农杆菌 A4 诱导胡萝卜产生毛状根与球状巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*)和根内根孢囊霉（*Rhizophagus intraradices*）建立双重培养体系采用含蔗糖 10 g·L^{-1} 的 M 培养基；在赵长竹（2005）的研究中，发根农杆菌 A4 诱导的柠檬毛状根与 *Gi. margarita* 和摩西球囊霉（*Glomus mosseae*）建立双重培养，1/10MS 培养基含 10 g·L^{-1} 蔗糖毛状根生长最好。邢晓科等（2003）建立地斗管囊霉(*Funneliformis geosporum*)与胡萝卜毛状根双重培养体系和曹玲（2009）用发根农杆菌 K599 诱导紫云英毛状根与 *Gi. margarita* 和玫瑰红巨孢囊霉（*Gigaspora rosea*）建立双重培养体系，MSR 培养基中蔗糖都是 10 g·L^{-1}。Srinivasan et al.（2014）建立了胡萝卜毛状根与异形根孢囊霉（*Rhizophagus irregularis*）双重培养体系，发现在培养 70 天后，产孢率更高，分析其原因可能与培养基中蔗糖含量降低有关，认为产孢率取决于培养基中的蔗糖浓度，不添加蔗糖的培养基产孢量更多；D'Souza et al.（2013）在研究 *Rh. irregularis* 孢子体外萌发时也发现了类似的趋势，无蔗糖更利于孢子萌发。Mohan et al.（2017）建立了胡萝卜毛状根与 *Rh. irregularis* 双重培养体系，发现 10 g·L^{-1} 蔗糖浓度最利于根系定殖，定殖率随蔗糖浓度的增加而显著降低，但是蔗糖浓度为 20 g·L^{-1} 和 30 g·L^{-1} 时新生孢子数大于 10 g·L^{-1}。目前，在 AM 真菌纯培养的研究中，诱导毛状根的材料大多数选用胡萝卜，也有选用柠檬（赵长竹，2005）、紫云英（曹玲，2009）、土豆（Puri & Adholeya，2013）等，而选用烟草的少见报道，且未有研究者探讨过使用烟草诱导毛状根与 AM 真菌孢子建立双重培养体系时，培养基中适宜毛状根生长的蔗糖浓度，我们后续将进一步完善烟草毛状根-AM 真菌双重培养体系，这就必须先建立生长状况良好的毛状根培养体系。

本研究结果表明，在 30 g·L^{-1} 蔗糖浓度下使用发根农杆菌 C58C1 诱导叶片均可长出毛状根，只是对两种烟草的诱导率有所不同：NC82（87.3%）的诱导率更高，是 Va116（38.6%）的 2.26 倍，这表明不同基因型材料会影响毛状根的诱导，此结果与李锦锦等（2012）的研究相符。李润田等（2020）的研究表明 30 g·L^{-1} 蔗糖浓度下西洋参不定根诱导率高于 15 g·L^{-1} 和 40 g·L^{-1}，本研究的结果表明 30 g·L^{-1} 的蔗糖浓度对于诱导烟草毛状根同样适用。NC82 和 Va116 诱导的毛状根分枝数量随培养时间而增加，增加量因蔗糖浓度而异；蔗糖浓度显著影响 NC82 和 Va116 诱导的毛状根分枝数量，因烟草品种和起始分枝数而异，毛状根分枝增长的抑制蔗糖浓度分别为 25 g·L^{-1} 和 15 g·L^{-1}。蔗糖浓度对毛状根 F（D）W 的影响因烟草品种而异，NC82 诱导的毛状根在 25 g·L^{-1} 时 F（D）W 最高 0.541 g（0.055 g）；而 Va116 诱导的毛状根在 15 g·L^{-1} 时最高，分别为 0.474 g（0.050 g）。所以，综合分枝数、F（D）W、毛状

根生长势的考虑，进一步确定了 NC82 诱导的毛状根最优生长蔗糖浓度为 25 $g \cdot L^{-1}$，Va116 诱导的毛状根最优生长蔗糖浓度为 15 $g \cdot L^{-1}$。

良好的毛状根培养体系是成功建立双重培养体系的关键。本研究优化了 NC82 和 Va116 两种烟草毛状根培养基组分配比，为毛状根大量扩繁奠定基础，为后期烟草毛状根-AM 真菌双重培养体系的建立奠定了良好的基础，也为其他植物材料诱导毛状根提供参考。

参考文献:

AUGÉ, ROBERT M, TOLER H D, et al., 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis[J]. Mycorrhiza, 25(1), 13-24.

BÉCARD, FORTIN, 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots[J]. New Phytol, 108(2):211-218.

BERRUTI A, LUMINI E, BALESTRINI R, et al., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes[J]. Front Microbiol, 6(426):1559.

BI YL, WANG HG, LI XL, 1999. Infection of VA mycorrhizal fungi on the root organs of transferred Ri T-DNA carrot[J]. J Plant Nutr Fert, 5(1):3-5. [毕银丽，汪洪钢，李晓林，1999. VA 菌根真菌对转移 Ri T-DNA 胡萝卜根器官的侵染[J]. 植物营养与肥料学报，5(1):3-5.]

BI YL, WANG HG, LI XL, 2000. The dual culture method of arbuscular mycorrhiza and the establishment of mycelium[J]. Bact Syst, 19(4):517-521. [毕银丽，汪洪钢，李晓林，2000. 丛枝菌根的双重培养方法及其菌丝际的建立[J]. 菌物系统，19(4):517-521.]

CAO L, 2009. Study on the spore germination of AM fungus and the establishment of dual culture system with *Astragalus vitis*[D]. Wuhan: Huazhong Agric Univ, 1-43. [曹玲，2009. AM 真菌孢子萌发及其与紫云英转化根双重培养体系建立的研究[D]. 华中农业大学，1-43.]

DING SP, YAN JQ, JI DP, 1998. Effect of sugar sources on plant tissue culture[J]. Chin Bull Bot, 15(6):42-46. [丁世萍，严菊强，季道藩，1998. 糖类在植物组织培养中的效应[J].植物学通报，15(6):42-46.]

D'SOUZA J, RODRIGUES KM, RODRIGUES BF, 2013. Modified Strullu and Romand (MSR) medium devoid of sucrose promotes higher germination in *Rhizophagus irregularis*[J]. J Mycol Plant Pathol, 43(2): 240-242.

GHRE V, PASZKOWSKI U, 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation[J]. Plant, 223(6):1115-1122.

GIBSON S I, 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling[J]. Curr Opin Plant Biol, 8(1) : 93.

HE HJ, LIANG P, SHI HP, 2005. Effects of sucrose and light on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots [J]. J Bioeng, 21(6):1003-1008. [何含杰，梁朋，施和平，2005. 蔗糖和光对三裂叶野葛毛状根生长及次生物质产生的影响[J]. 生物工程学报，21(6):1003-1008.]

HODGE A, CAMPBELL C D. FITTER A H, 2001. Anarbuscular mycorrhizat fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material[J]. Nat, 413(6853):297-299.

HU X, TANG Y, LI T, et al., 2015. Study on tomato hairy root induction by different *Agrobacterium rhizogenes* stains [J]. Guangdong Agric Sci, 42(3):20-23+2. [胡霄，唐瑶，李婷，等，2015. 不同发根农杆菌菌株诱导番茄毛状根的研究[J]. 广东农业科学，42(3):20-23+2.]

HUANG LP, TANG Y, JIANG L, 2012. Effects of *Agrobacterium rhizogene* strains and tobacco varieties on the transformation rate of hairy root[J]. J Mt Agric Biol, 31(4):293-296.[黄丽萍，唐瑶，江龙. 发根农杆菌菌株和烟草品种对毛状根诱导率的影响[J].山地农业生物学报，31(4):293-296.]

JIANG L, WANG MS, HUANG JG, et al., 2010. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus on nutrient absorption from substrate by tobacco seedlings[J]. Guizhou Agric Sci, 38(6) : 50-53. [江龙，王茂胜，黄建国，等，2010. 丛枝菌根真菌对烟苗吸收基质养分的影响[J]. 贵州农业科学，38(6):50-53.]

JOLICOEUR M, WILLIAMS R D, CHAVARIE C, et al., 1999. Production of *Glomus*

intraradices propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor[J]. Biotechnol Bioeng, 63(2):224-232.

KREGTENMV, PATERSDE, ROMEIJN R, et al., 2016. T-DNA integration in plants results from polymerase mediated DNA repair[J]. Nat Plant, 2(11):16-64.

LEIFHEIT E.F, VERESOGLOU S, LEHMANN A, et al., 2014. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation-a meta-analysis[J]. Plant Soil, 374(1):523-537.

LI FH, TANG SH, SUN M, 2004. Induction and culture of hairy-root by *Agrobacteriun rhizogenes* in *Dendrobium nobile* [J]. Chin Herbal Med, 27(10):712-714. [李凤华，汤绍虎，孙敏，2004. 石斛毛状根诱导及培养条件的优化[J]. 中药材，27(10):712-714.]

LI JJ, WANG F, ZHANG WK, et al., 2012. Transformation frequency screeening different soybean genotypes mediated by *Agrobacterium rhizuogene* [J]. Henan Agric Sci, 41(5):37-41. [李锦锦，王昉，张万科，等，2012. 发根农杆菌介导不同基因型大豆转化效率的筛选[J]. 河南农业科学，41(5):37-41.]

LI RT, LIU ZK, ZOU D, et al., 2020. Effects of culture conditions on induction of adventitious roots of *Panax quinquefolium* [J]. Guihaia, 40(4):557-566. [李润田，刘志琨，邹丹等，2020. 培养条件对西洋参不定根诱导的影响[J]. 广西植物，40(4):557-566.]

LIU DY, SHI BS, LI YH, et al., 2005，The bulbs augmentation influenced by the carbon resources PP333 and GA3 during the low lily tissue culture [J]. J Hebei Agric Univ, 28(2):32-35. [刘冬云，史宝胜，李银华，等，2005. 不同碳源及 PP333、GA3 对山丹组培苗鳞茎增大的影响[J]. 河北农业大学学报，28(2):32-35.]

LIU G, RAO LQ, YANG H, 2007. Research on elements influencing growth and the production of secondary metabolites in hairy roots[J]. Lett Biotechnol, 18(5):888-890. [刘高，饶力群，杨华，2007. 影响毛状根生长及其次生代谢产物合成因素的研究进展[J]. 生物技术通讯，18(5):888-890.]

LIU RJ, CHEN YL, 2007. Mycorrhiza[M]. Beijing: Sci Press, 1-447. [刘润进，陈应龙，2007. 菌根学[M]. 北京：科学出版社，1-447.]

LIU XB, LUO HY, MIN C, et al., 2018. Effects of hairy root configuration on growth of *Psammosilene tunicoides*[J]. Guihaia, 38(7) : 859-865. [刘兴斌，雒怀宇，闵聪，等，2018. 金铁锁毛状根构型对其生长的影响[J]. 广西植物，38(7):859-865.]

LU XF, 2020. Study on double culture of tobacco hairy roots and *Claroideoglomus etunicatum* abstract[D]. Guiyang: Guizhou Univ: 1-43. [卢锡锋. 烟草毛状根与幼套近明球囊霉双重培养体系的建立[D]. 贵阳：贵州大学：1-43.]

LV ZX, 1981. The effect of carbon source type and concentration on the growth of callus[J]. Plant Physiol Comm, (6):3-7. [吕芝香，1981. 碳源种类和浓度对愈伤组织生长的影响[J]. 植物生理学通讯，(6):3-7.]

MARÍA J POZO, CONCEPCIÓN AZCÓN-AGUILAR, 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance[J]. Curr Opin Plant Biol, 10(4):393-398.

MEIER, SEBASTIÁN, CORNEJO P, et al., 2015. Interactive effect between Cu-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of Oenothera picensis growing in Cu-polluted soils[J]. J Plant Nutr Soil Sci, 178(1):126-135.

MOHAN RAJ B, BHARATH KUMAR R, VENKATA RAO G, et al., 2017. An optimised *in vitro* protocol for mass production of *Rhizophagus irregularis* spores - for sustainable agriculture[J]. Afr J Biotechnol, 9(2):21-29.

NETO V B DE P, OTONI W C, 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue

culture: does it matter [J]. Sci Hort-Amsterdam, 97(3-4):193-202.

PORCEL R , AROCA R , RUIZ-LOZANO J M, 2012. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review[J]. Agron Sustain Dev, 32(1):181-200.

PURI A, ADHOLEYA A，2013. A new system using *Solanum tuberosum* for the co-cultivation of Glomus intraradices and its potential for mass producing spores of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Symbiosis, 59(2):87-97.

RAN HY, 2006. Optimization of AM fungal secondary spore production conditions in vitro[D]. Guiyang: Guizhou Univ: 1-52. [冉海燕，2006. 离体培养环境下 AM 真菌次生孢子产生条件的优化[D]. 贵阳：贵州大学：1-52.]

RILLIG MC, MUMMEY DL, 2010. Mycorrhizas and soil structure[J]. New Phytol, 171(1):41-53.

SRINIVASAN M, KUMAR K, KUMUTHA K et al., 2014. Establishing monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* through root organ culture[J]. J Appl Nat Sci, 6(1):290-293.

STAIKIDOU I, WATSON S, BARBARA M R, et al.，2005. Narcissus bulblet formation *in vitro*：effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 80(3):313-320.

TIAN CT, LV HF, WANG F, et al., 2007. Effects of medium components on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of *Picea wilsonii* Mast[J]. J Beijing Forest Univ, 29(1):47-52. [田翠婷，吕洪飞，王锋，等，2007. 培养基组分对青杆离体花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 北京林业大学学报，29(1):47-52.

WANG DD, WEI R, ZHANG W, et al., 2019. Effect of soil water content and inoculation with *Funneliformis mosseae* on growth of *Bretschneidera sinensis* seedlings[J]. Guihaia, 39(7):976-985. [王丹丹，魏蓉，张薇，等，2019. 土壤水分含量和接种摩西斗管囊霉(*Funneliformis mosseae*)对伯乐树幼苗生长的影响[J]. 广西植物，39(7):976-985.

XIA TJ, WU QS, SHAO YD, et al., 2018. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth，lateral root number and root endogenous hormones of *Camellia sinensis* 'Fuding Dabaicha' [J]. Guihaia, 38(12):1635-1640. [夏庭君，吴强盛，邵雅东，等，2018. 丛枝菌根真菌对福鼎大白茶生长、侧根数和根系内源激素的影响[J]. 广西植物，38(12):1635-1640.]

XING XK, LI Y, WANG Y, et al., 2003. Establishment of dual culture system of ginseng VA mycorrhizal fungi[J]. J Jilin Agr Univ, 25(2):154-157. [邢晓科，李玉，王义，等，2003. 人参 VA 菌根真菌双重培养体系的建立[J]. 吉林农业大学学报，25(2):154-157.]

YANG R, FU CX, JIN ZP, et al., 2005. Effects of physical and chemical factors on hairy root growth and flavonoids biosynthesis in the cultures of *Saussurea medusa* maxim hairy root[J]. Chin J Biotechnol, 21(2) : 233-238. [杨睿，付春祥，金治平，等，2005. 不同理化因子对雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响[J]. 生物工程学报，21(2):233-238.]

ZHAO CZ, 2005. Hairy roots induction of Citrus and dual culture of them associated with arbuscular mycorrhizal fungi[D]. Wuhan: Huazhong Agricultral Univesity: 1-33. [赵长竹，2005. 柑橘毛状根的诱导及其与丛枝菌根真菌的双重培养[D]. 武汉：华中农业大学：1-33.]